



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



HOSPITAL ESPAÑOL

HOSPITAL ESPAÑOL DE MÉXICO

***Prevalencia de aneuploidías en blastocistos de día 5 versus día 6:
desfase de 24 horas como factor determinante***

***TESIS DE POSGRADO PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN
BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA.***

PRESENTA:

DR. DAVID ALEJANDRO LAGUNA PÉREZ

ASESOR DE TESIS

DR. CARLOS GERARDO SALAZAR LÓPEZ ORTIZ

CIUDAD DE MÉXICO

2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

FIRMAS DE VALIDACIÓN DE DOCUMENTO

DR. MANUEL ÁLVAREZ NAVARRO
JEFE DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN
HOSPITAL ESPAÑOL DE MÉXICO

DR. CARLOS GERARDO SALAZAR LÓPEZ ORTIZ
JEFE DE SERVICIO Y DEL CURSO DE ESPECIALIZACIÓN DE BIOLOGÍA DE LA
REPRODUCCIÓN
HOSPITAL ESPAÑOL DE MÉXICO

DR. SERGIO TÉLLEZ VELASCO
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN
HOSPITAL ESPAÑOL DE MÉXICO

DR. DAVID ALEJANDRO LAGUNA PÉREZ
AUTOR
MÉDICO RESIDENTE DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN
HOSPITAL ESPAÑOL DE MÉXICO

DEDICATORIA

A mi padres Ángel y Rosa, y a mis hermanos Ania y Luis.

Todos mis logros han sido posibles gracias a ustedes.

A mi novia Carlita.

Gracias por tu apoyo incondicional y por siempre darme ánimos.

Al doctor Carlos Gerardo Salazar López Ortiz.

Maestro, amigo y ejemplo a seguir durante mi preparación como
ginecólogo y biólogo de la reproducción.

**A mis maestros, compañeros y amigos: Gonzalo, Felipe, Jorge,
Carlos, Esteban, Eugenia y Paladino.**

2 años de aprendizaje que fueron más amenos gracias a ustedes.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	6
2. MARCO TEÓRICO	6
2.1 MARCO CONCEPTUAL	7
2.2 ANTECEDENTES	7
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	9
4. JUSTIFICACIÓN	10
5. OBJETIVOS	10
5.1 OBJETIVO PRIMARIO	10
5.2 OBJETIVO SECUNDARIO	10
6. HIPÓTESIS	11
6.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO	11
6.2 HIPÓTESIS NULA	11
7. TIPO DE ESTUDIO	11
8. POBLACIÓN	11
8.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN	11
8.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	11
8.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN	11
9. DESCRIPCIÓN DE PROCEDIMIENTOS	12
10. VARIABLES	13
10.1 OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES	13
11. MÉTODOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS	14
11.1 RECURSOS MATERIALES	14
12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	14
13. CONSIDERACIONES ÉTICAS	15
13.1 CLASIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	15
13.2 RIESGOS PREVISIBLES Y PROBABLES	15
13.3 MEDIDAS DE PROTECCIÓN FRENTE AL RIESGO FÍSICO Y/O EMOCIONAL	15
13.4 CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO	15
13.5 ARCHIVO CONFIDENCIAL DE LA INVESTIGACIÓN	15
14. MATERIAL Y MÉTODOS	16
15. RESULTADOS	18
16. DISCUSIÓN	19
17. CONCLUSIONES	20
18. REFERENCIAS	21

19. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	23
20. ANEXOS.....	24
CUADROS	24
FIGURAS	25

RESUMEN

Introducción. El estudio genético preimplantacional para la detección de aneuploidías es un test utilizado hoy en día para estudiar a los embriones previo a transferirlos. Actualmente, existe la tendencia a realizar este estudio y transferir embriones en etapa de blastocisto (previa vitrificación embrionaria), para lograr este estadio se necesitan 5 días posterior a su fecundación, empero, existen algunos que requieren 6 días para lograr llegar a esta etapa. **Objetivo.** Establecer la prevalencia de aneuploidías en blastocistos biopsiados en día 5 y día 6 por medio de diagnóstico genético preimplantacional en la clínica de reproducción asistida del Hospital Español de la Ciudad de México, HISPAREP. **Material y métodos.** Realizaremos un estudio retrospectivo, transversal, observacional y descriptivo en donde compararemos el estado de ploidía en blastocistos de día 5 y día 6 de parejas infértiles, para conocer si el desfase en el desarrollo embrionario de 24 horas es determinante para la prevalencia de aneuploidías. Los blastocistos estudiados con diagnóstico genético preimplantacional (DGP) fueron obtenidos a partir de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) entre 2016 y 2020. Comparamos la prevalencia de aneuploidías entre blastocistos de día 5 (D5) vs de día 6 (D6) en diferentes edades maternas y paternas. Se realizó la biopsia en trofoectodermo acorde a los criterios de “La Sociedad Internacional de Diagnóstico Genético de Preimplantación” (Preimplantation Genetic Diagnosis International Society, “PGDIS”). Los embriones biopsiados fueron vitrificados. **Resultados.** Se analizaron los blastocistos de 127 parejas, para un total de 468 embriones. El desfase de 24 horas para llegar a la etapa de blastocisto D5 versus D6 se relacionó con un mayor porcentaje de aneuploidías, 49.25% vs 68.81%, respectivamente. Además, los blastocistos de gametos femeninos en pacientes de 38 años o mayores, tuvieron un porcentaje de aneuploidía significativamente superior (72.58%), respecto a los de las mujeres de 37 años o menores (41%). **Conclusiones.** Los blastocistos de D5 se relacionan con un mayor porcentaje de embriones euploides, la edad es una variable que confiere mayor riesgo de aneuploidías, reforzando la teoría de que un blastocisto D6 de mujeres mayores de 38 años se relaciona con una mayor tasa de aneuploidías respecto a blastocistos D5 de

mujeres de 37 años o menores, 86.3% vs 32.5 respectivamente (OR 13, IC 95% 6.6-25.7, $p < .001$).

1. INTRODUCCIÓN

Las técnicas de reproducción asistida de alta complejidad han ido evolucionando a lo largo de los años, desde el primer caso de éxito en 1978 con el nacimiento de Louise Brown, hasta ahora, en donde es posible estudiar genéticamente a los embriones.

El estudio genético preimplantacional para la detección de aneuploidías es un test utilizado hoy en día para estudiar a los embriones previo a transferirlos. Actualmente, existe la tendencia a realizar este estudio y transferir embriones en etapa de blastocisto (previa vitrificación embrionaria), para lograr este estadio se necesitan 5 días posterior a su fecundación, empero, existen algunos que requieren 6 días para lograr llegar a esta etapa.

Al realizar DGP podemos evaluar genéticamente como se encuentran los embriones estudiados, esto nos permite decidir cuáles son aptos para ser transferidos, evitando someter a las pacientes a transferencias con mal pronóstico, embarazos con desenlace de aborto y pérdida gestacional recurrente, así como el riesgo de un embarazo de un embrión con alguna cromosomopatía compatible con la vida.

La edad es un factor pronóstico importante, existen diversas clasificaciones mundiales con las cuales podemos evaluar a las pacientes, aunque no son diagnóstico, nos ayudan a generar un pronóstico respecto a los resultados que probablemente vamos a obtener al realizar una estimulación ovárica controlada, intuyendo así el número de ovocitos que pudieran obtenerse, cuántos de estos posterior a la fecundación llegaran a etapa de blastocisto y el desenlace genético de los embriones logrados.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Marco conceptual.

La transferencia de embriones en etapa de blastocisto ha ido incrementando popularidad, además de mejorar la tasa de implantación, esta estrategia promueve la transferencia de un solo embrión, reduciendo el riesgo de embarazo múltiple, los cuales se asocian a complicaciones maternas y neonatales¹. La meta principal de las técnicas de reproducción asistida es la de seleccionar al embrión con mayor potencial de desarrollo para lograr un recién nacido sano². Las anomalías genéticas, son la principal causa de aborto, representando cerca del 50% de éstos³. Se ha visto que conforme aumenta la edad, la incidencia de cromosomopatías incrementa, este panorama se observa cada vez más debido a la edad en la que las parejas intentan embarazarse hoy en día⁴.

Actualmente, el DGP es una herramienta utilizada para estudiar a los blastocistos previo a su transferencia, esto ha incrementado la tasa de éxito en las transferencias embrionarias, empero, no garantiza la implantación^{3,5}. Su uso tiene indicaciones muy precisas: en pacientes mayores de 38 años, antecedentes de falla en la implantación, pérdida gestacional recurrente, selección de sexo, hijo previo con alguna anomalía genética, entre otras³. Actualmente su utilidad cada vez es mayor, aplicándose para selección embrionaria, aunque tiene alta sensibilidad y especificidad, no es un estudio diagnóstico⁶. Los estudios más actuales de DGP reportan resultados variables, algunos asocian una blastulación retardada con mayor riesgo de presentar aneuploidías, endometrio asincrónico, mientras otros reportan lo contrario⁷. Este estudio se diseñó fundamentalmente como método de selección embrionaria, el objetivo principal fue optimizar los resultados de las técnicas de reproducción asistida de alta complejidad⁸.

Para realizar DGP se requiere de reproducción asistida de alta complejidad, así como de realizar una biopsia al embrión o analizar su ambiente (masa celular interna, trofoectodermo, medio de cultivo, cuerpo polar, entre otras). La más utilizada en nuestro centro de reproducción es la biopsia del trofoectodermo, considerado el precursor de la

placenta, sus 3 ventajas principales son: primera, no afecta la formación del feto al no biopsiar la masa celular interna. Segundo, en la etapa de blastocisto, la activación del genoma permite un análisis más exacto. Tercero, una muestra de 6-8 células es necesaria, lo que representa menos del 10% de un blastocisto⁹.

El Test genético preimplantacional para aneuploidías (PGT-A, por sus siglas en inglés): identifica embriones euploides y aneuploides, es decir, alteraciones numéricas en los cromosomas, lo que permite realizar la transferencia de un embrión euploide y aumentar las posibilidades de éxito del tratamiento de reproducción asistida¹⁰.

Nuestra hipótesis busca comprobar que existe una prevalencia de aneuploidías cromosómicas mayor en blastocistos D6 comparado con blastocistos D5. Con esto, demostrar que la edad y la blastulación retardada son determinantes para el desarrollo embrionario.

2.2 Antecedentes

A lo largo de los años, diversos estudios han surgido respecto al estado de ploidía de los blastocistos. Tian et al. (2016) reportaron que de 643 blastocistos D5, 340 (52.9%) fueron euploides y 303 (47.1%) se reportaron aneuploides, en contraste con 157 blastocistos D6, en donde 67 (43.5%) fueron euploides y 87 (56.5%) aneuploides ($p < 0.05$), concluyendo que los blastocistos D6 se asociaron con mayor incidencia de aneuploidía respecto a los D5¹². Taylor et al. (2014) realizaron biopsia de embriones y estudiaron 403 blastocistos 229 D5 y 180 D6, obteniendo una prevalencia de aneuploidías del 45.4% (104/229) y 57.2% (93/180) respectivamente, demostrando un incremento del 10% de aneuploidías en blastocistos con una blastulación desfasada 24 horas¹³.

Roelens and colleagues (2020) sugirieron que blastocistos D6 tienen la capacidad de implantarse, empero, con una ventana de implantación más estrecha que los blastocistos D5¹⁴. Aunque no realizaron PGT-A podemos inferir que existe relación en el desenlace de nuestros embriones con los analizados por Roelens. Park et al.

(2020) analizaron blastocistos D5 (933) y D6 (224), reportaron menor prevalencia de aborto en D5 (10.7%-29.3% [<0.001]), mayor en implantación en D5 (53.1%-44.2% [<0.023]), mayor en nacidos vivos en D5 (51.8%-33.5% [<0.001]), concluyendo que los blastocistos D5 tienen un mejor desenlace¹⁵. Wu et al. (2020) reportaron que los embriones de día 3 (D3) se relacionaron con una tasa de nacidos vivos baja en comparación con blastocistos, independientemente de si son D5 o D6¹⁶. Nosotros no comparamos embriones D3, empero, este estudio denota la relación que existe entre la etapa del desarrollo embrionario y su desenlace.

Vagini et al. (2020) usando PGT-A relacionaron la edad con aneuploidías, viendo incrementada su prevalencia y reportando el síndrome de Klinefelter como la cromosomopatía más frecuente ($18/71 = 25\%$)¹⁷. Kroener et. al (2012) analizando blastocistos D5 y todos aquellos con desfase de al menos 24 horas (mórulas D5 y D6, blastocistos D6), evaluaron el grado morfológico, reportaron que los que tuvieron un desfase de 24 horas no mostraron una diferencia significativa en presentar aneuploidías, sin embargo, le dieron mayor importancia al grado morfológico, es decir, un embrión óptimo, independientemente del día de desarrollo, tiene altas posibilidades de ser euploide¹⁸.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El desfase de 24 horas en el desarrollo embrionario para lograr la etapa de blastocisto puede ser un factor determinante en la prevalencia de aneuploidías?

4. JUSTIFICACIÓN

Realizar este protocolo nos ayudará a demostrar que los blastocistos con un desarrollo tardío a D6 se asocia con una mayor tasa de aneuploidías respecto a los blastocistos D5. Además, el deterioro progresivo de los ovocitos con el paso de los años, afecta su calidad de manera importante a partir de los 38 años.

El DGP es una herramienta que nos permite discernir entre un blastocisto morfológicamente óptimo y viable en relación a su condición de ploidía y con ello promover la disminución de la tasa de aborto e incrementar el porcentaje de transferencias exitosas. Los estudios previamente realizados reportan resultados diversos, determinar el posible estado de ploidía de los blastocistos nos ayudaría a establecer un pronóstico más adecuado.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo primario.

Establecer la prevalencia de aneuploidías en blastocistos biopsiados en día 5 y día 6.

5.2 Objetivo secundario

Demostrar que tan determinante es la edad respecto al estado de ploidía de un embrión.

6. HIPÓTESIS

6.1 Hipótesis de trabajo

El desfase de 24 horas en el desarrollo embrionario para lograr la etapa de blastocisto es un factor determinante en la prevalencia de aneuploidías.

6.2 Hipótesis nula

El desfase de 24 horas en el desarrollo embrionario para lograr la etapa de blastocisto no es un factor determinante en la prevalencia de aneuploidías.

7. TIPO DE ESTUDIO

Este es un estudio observacional, transversal, retrospectivo y descriptivo.

8. POBLACIÓN.

8.1 Criterios de inclusión

- ❖ Pacientes que realizaron ciclo de estimulación ovárica controlada en clínica de reproducción asistida Hisparep del Hospital Español de México.
- ❖ Gametos homólogos.
- ❖ Muestra espermática con diagnóstico de teratozoospermia.
- ❖ Blastocistos de día 5 y día 6 con PGT-A.

8.2 Criterios de exclusión

- ❖ Cigotos de día 3
- ❖ Gameto masculino sin diagnóstico de teratozoospermia.
- ❖ Gametos heterólogos.

8.3 Criterios de eliminación

- ❖ Blastocistos sin PGT-A.

9. DESCRIPCIÓN DE PROCEDIMIENTOS

Se realizó un estudio de cohorte retrospectiva, observacional y descriptivo en blastocistos con PGT-A que fueron obtenidos a partir de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) entre 2016 y 2020. Comparamos la prevalencia de aneuploidías entre blastocistos de día 5 (D5) vs de día 6 (D6) en diferentes edades maternas y paternas. Se realizó la biopsia en trofoectodermo acorde a los criterios de “La Sociedad Internacional de Diagnóstico Genético de Preimplantación” (Preimplantation Genetic Diagnosis International Society, “PGDIS”). Los embriones biopsiados fueron vitrificados.

10. VARIABLES

10.1 Operacionalización de las variables

Variable	Definición	Unidad de medición	Relación causal	Escala	Estadístico
Edad de la paciente	Tiempo transcurrido desde el nacimiento	Años	Independiente	Cuantitativa discreta Cualitativa ordinal	Media y desviación estándar. Ji-cuadrada
Día de desarrollo embrionario para lograr etapa de blastocisto	Tiempo transcurrido desde la fecundación	Días	Dependiente	Cuantitativa discreta Cualitativa ordinal	Ji-cuadrada
Estado de ploidía	Número de pares completos de cromosomas	Unidades	Dependiente	Cualitativa ordinal Cuantitativa discreta	Media y desviación estándar Ji-cuadrada

11. MÉTODOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

11.1 Recursos materiales

Los datos obtenidos fueron recolectados de los expedientes de los pacientes que cumplieron con los criterios mencionados, se encuentran registrados en una base de datos de un documento Excel.

12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis estadístico, descriptivo con gráficas de barras y tablas de contingencia de los datos obtenidos, para el análisis descriptivo se utilizaron frecuencias y proporciones para las variables categóricas, media y desviación estándar. Para el análisis de la relación entre variables se utilizó prueba de Ji-cuadrada.

La información analizada fue generada de una misma base de datos, respecto a su ploidía. Se incluyeron todas aquellas parejas sometidas a ciclo de estimulación ovárica controlada con gametos homólogos, factor masculino de teratozoospermia (con o sin otros factores alterados), blastocistos D5 y D6 con PGT-A. Se excluyeron parejas con gametos heterólogos, embriones sin criterios de blastulación y los que tuvieran muestra seminal con normozoospermia o alteraciones sin teratozoospermia.

Comparamos blastocistos de D5 y D6, se analizaron acorde a edad y a día de blastulación (**Figura 2**). Creamos 4 subgrupos. 1A: fueron blastocistos D5 de mujeres de 37 años o menores, 2A: blastocistos D6 de mujeres de 37 años o menores, 1B: blastocistos D5 de mujeres de 38 años o mayores y el 2B: blastocistos D6 de mujeres de 38 años o mayores (**Figura 3**). Realizamos estimación de riesgo de aneuploidías por medio de ji-cuadrada (**Cuadro 2**). Calculamos porcentaje de aneuploidías en blastocistos D5 y D6, aplicando la variable edad (mujer), grupos 1A y/o 1B vs 2A y/o 2B (**Cuadro 1**), con una gráfica de barras representamos la prevalencia de euploidías y aneuploidías por día de desarrollo embrionario, edad y los diversos subgrupos [Figura 2 y 3]. Para todas las comparaciones se consideró un intervalo de confianza de 95% y se determinaron valores de $p < .001$ con significancia estadística en cada una de las pruebas (**Cuadro 2**).

13. CONSIDERACIONES ÉTICAS

13.1 Clasificación de la investigación: Sin riesgo.

13.2 Riesgos previsible y probables: Sin riesgo.

13.3 Medidas de protección frente al riesgo físico y/o emocional: No aplica.

13.4 Carta de consentimiento informado: Aviso de privacidad Hisparep.

13.5 Archivo confidencial de la investigación: Nuestra base de datos está resguardada, sólo tienen acceso los investigadores del estudio.

La investigación se llevó a cabo considerando lo estipulado en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de investigación para la Salud 1987, y en la Declaración de Helsinki, considerando aspectos éticos que garantizan la dignidad y el bienestar de la persona sujeta a investigación.

14. MATERIAL Y MÉTODOS.

Realizamos un estudio retrospectivo, transversal, observacional y descriptivo en donde compararemos el estado de ploidía en blastocistos de día 5 y día 6 de parejas infértiles, para conocer si el desfase en el desarrollo embrionario de 24 horas es determinante para la prevalencia de aneuploidías. Los blastocistos estudiados con PGT-A fueron obtenidos a partir de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) entre 2016 y 2020. Comparamos la prevalencia de aneuploidías entre blastocistos de día 5 (D5) vs de día 6 (D6) en diferentes edades maternas y paternas. Se realizó la biopsia en trofoectodermo acorde a los criterios de “La Sociedad Internacional de Diagnóstico Genético de Preimplantación” (Preimplantation Genetic Diagnosis International Society, “PGDIS”). Los embriones biopsiados fueron vitrificados.

Se incluyeron un total de 127 pacientes a quienes se les realizó estimulación ovárica controlada (EOC). Se obtuvieron un total de 1112 ovocitos, los cuales se fecundaron con semen homólogo, tomando como criterio de inclusión el diagnóstico de teratozoospermia, acorde a los criterios de la OMS 2010¹¹. Se realizó una biopsia de trofoectodermo en etapa de blastocisto D5 o D6 y PGT-A a un total de 468 embriones, de los cuales 266 fueron de D5 y 202 de D6 (**Figura 1**).

Se utilizaron diversos medicamentos para la EOC; gonadotropinas hipofisarias: a base de folitropina alfa (vía subcutánea (SC)), combinación de folitropina alfa y lutropina alfa (SC) y gonadotropinas menopáusicas humanas (SC); antagonistas de GnRh (acetato de cetrorelix) (SC), siguiendo el protocolo de Lübeck¹¹; se realizó el disparo con hCG o acetato de leuprolide con 10,000 IU y 2 mg (SC e intramuscular (IM)), respectivamente, cuando el diámetro de 2 o más folículos alcanzaran los 18 mm, esto según las preferencias del médico tratante o el riesgo de hiperestimulación ovárica, la aspiración folicular de cada uno de estos procedimientos se realizó de 34-36 horas posteriores al disparo.

Terminada la aspiración folicular, los ovocitos fueron evaluados acorde a la clasificación de Veeck de tres grados¹¹, en donde los de grado 1 fueron seleccionados para realizar el proceso de fecundación in vitro, los ovocitos grado 2 y 3 se mantuvieron

en medio de cultivo para ser evaluados nuevamente e intentarlos fecundar por medio de ICSI, los que llegaron a etapa de blastocisto fueron biopsiados, los que no cumplieron con los criterios no se les realizó PGT-A y posteriormente fueron desechados.

Posterior a la fecundación, los embriones fueron puestos en medio de cultivo, evaluados día a día hasta llevarlos a etapa de blastocisto, alcanzada en D5 o D6, acorde a los criterios de Gardner¹¹: estatus de expansión y eclosión 5 o 6; masa celular interna A o B; trofoectodermo grado A o B. Para el PGT-A se realizó biopsia de trofoectodermo en estadio de blastocisto, el estado mínimo esperado para la toma de biopsia fue 5-B-B, de no cumplir este criterio, los blastocistos no eran estudiados; se analizaron todos los cromosomas mediante la técnica de secuenciación masiva de nueva generación (NGS), la cual permite efectuar el análisis preciso de todos los cromosomas en múltiples muestras, la amplificación del genoma la hace una técnica más simple, eficiente y accesible¹¹.

La biopsia fue realizada utilizando un microscopio Invertido Nikon Eclipse TE2000U (Japón), por medio de una pipeta de sujeción, en blastocisto en eclosión o previa eclosión inducida con láser ZILOS-tk (USA), se aspiraron un mínimo de 6 a 12 células de trofoectodermo a cada blastocisto con una pipeta de biopsia (MBB-FP-SM-30, ORIGIO; USA), se expusieron en un buffer de lavado en microtubos eppendorf para PCR de 0.2 mililitros con un buffer de lisis de 2 µl, para posteriormente realizar el estudio genético.

Los blastocistos fueron vitrificados posterior a la biopsia de trofoectodermo mediante el método de cryotech. Para tal efecto se colocaron los embriones en solución de equilibrio por 15 minutos a temperatura ambiente y en solución de vitrificación en un tiempo no mayor a 1 minuto. Posteriormente se introdujeron en cryolocks, los cuales se preservaron en un criobanco con nitrógeno líquido para su almacenaje indefinido a -196°C, siendo posible utilizarlos meses o años después.

15. RESULTADOS

Analizamos 468 blastocistos de 127 pacientes, la edad media de ellas fue de 38.38 años (28-44 años). 266 embriones (56.83%) fueron blastocistos D5; de éstos 135 (50.75%) fueron euploides y 131 (49.25%) aneuploides. Los blastocistos D6 mostraron un porcentaje de aneuploidía superior; de 202 (43.17%) blastocistos analizados 63 (31.19%) fueron euploides y 139 (68.81%) fueron aneuploides (**Figura 2**).

Obtuvimos una prevalencia de aneuploidía en blastocistos D5 de 49.25% y en D6 de 68.81% [Figura 2]. Los blastocistos D6 con riesgo 2.2 veces mayor de ser aneuploides en comparación con los blastocistos D5 (OR 2.2, IC 95% 1.5-3.3, $p<.001$) (**Cuadro 2**). Al comparar los blastocistos por edad de la mujer, independientemente del día de blastulación, obtuvimos una prevalencia de aneuploidías en blastocistos de mujeres ≤ 37 años del 41% y en mujeres ≥ 38 años de 72.58% (OR 3.8, IC 95% 2.5-5.6, $p<.001$) (**Cuadro 2**).

Cuando agregamos la variable edad al día de blastulación y dividimos los grupos en 37 años o menores y en 38 años o mayores (**Figura 3**), observamos que la brecha de normalidad entre los grupos se separó aún más, con una prevalencia de aneuploidías en los subgrupos 1A y 1B de 32.5% y 63% respectivamente (OR 3.5, IC 95% 2.1-5.8, $p<.001$) (**Cuadro 2**). Entre los subgrupos 2A y 2B se presentó una prevalencia de aneuploidía de 51% y 86.3% (OR 6, IC 95% 3-12, $p<.001$) (**Cuadro 2**). Al realizar un análisis entre los subgrupos extremos, es decir, 1A vs 2B, observamos una prevalencia de aneuploidía de 32.5 vs 86.3% (OR 13, IC 95% 6.6-25.7, $p<.001$) (**Cuadro 2**). El desfase de 24 horas en el desarrollo embrionario para lograr la etapa de blastocisto y la edad de la mujer son factores que tienen un impacto significativo en el desarrollo embrionario ($p<.001$) (**Cuadro 2**).

16. DISCUSIÓN

Nuestra hipótesis comprobó que existe una prevalencia de aneuploidías cromosómicas mayor en blastocistos D6 comparado con blastocistos D5. En los 468 blastocistos observamos que la edad y la blastulación retardada son determinantes para el desarrollo embrionario.

Lo reportado en los estudios revisados reportan que una blastulación retardada se relaciona con mayor incidencia de aneuploidías, pudiendo observar cromosomopatías miscelaneas, siendo las principal causa de aborto o de falla en la implantación. Esta controversia existe en México y a nivel mundial, sin embargo, no existen muchos estudios en México como para realizar un comparativo de resultados que tendría nuestra población general.

Se analizaron los blastocistos de 127 mujeres, observando que la edad también forma parte del factor pronóstico, de manera general pudimos analizar 220 blastocistos de mujeres 37 años o menores y 248 blastocistos de mujeres de 38 años o mayores observando que la edad aumenta el riesgo de embriones con aneuploidías, independientemente del día de blastulación, reportando el grupo con mayor prevalencia de embriones anormales a las mujeres de 38 años o mayores con blastocistos D6.

Hasta ahora no existe un consenso acerca de la relación del desfase de 24 horas en el desarrollo embrionario con el estado de ploidía de los embriones, sin embargo, en los estudios revisados y los resultados obtenidos podemos observar de manera significativa que una blastulación retardada si incrementa el riesgo de cromosomopatías.

En un estudio realizado por Rubio (2018), describió que los grupos con PGT-A en 205 mujeres de 38 a 41 años, 538 embriones biopsiados fueron analizados, 100 con PGT-A y 105 sin PGT-A obteniendo los siguientes resultados: del grupo con PGT-A el 52.8% de las transferencias se implantaron, 2.7% se abortaron y el porcentaje de nacidos vivos por transferencia fue de 64.7%, de los que no tuvieron test genético los porcentajes fueron de 27.6% de implantación, 39% de aborto y el 24.2% de nacidos vivos por transferencia.¹⁹ Denotando la importancia de realizar DGP.

Nuestros resultados no concuerdan con Kroener (2012), debido a que nosotros si encontramos relación directa con el desfase en el desarrollo embrionario, sin embargo, no incluimos embriones sin blastulación, solo comparamos blastocistos, ya que acorde a Wu (2020), Vagini (2020), Park (2020), Roelens (2020), Rubio (2018), Taylor (2014) y Tian (2016), la calidad embrionaria y la prevalencia de aneuploidías se relacionan con una adecuado desarrollo embrionario y con la edad de la mujer.

17. CONCLUSIONES

Nuestro estudio demostró que los blastocistos con un desarrollo tardío a D6 se asoció con una mayor tasa de aneuploidías respecto a los blastocistos D5. Podemos observar el deterioro progresivo de los ovocitos con el paso de los años, afectando su calidad a partir de los 38 años. Observamos en blastocistos D6 un riesgo de 2.2 veces mayor de presentar aneuploidías respecto a los D5 (**Cuadro 2**); los blastocistos D5 de mujeres de 38 años o mayores mostraron un riesgo de 3.5 veces mayor de tener aneuploidías respecto a las mujeres con blastocistos D5 de 37 años o menores (**Cuadro 2**). En blastocistos D6 en mujeres de 38 años o mayores, se observó un riesgo de 13 veces mayor de padecer alguna aneuploidía en comparación con los blastocistos D5 en mujeres de 37 años o menores (**Cuadro 2**).

Podemos concluir que el PGT-A es una herramienta que nos permite discernir entre un blastocisto morfológicamente óptimo y viable en relación a su condición de ploidía y con ello promover la disminución de la tasa de aborto e incrementar el porcentaje de transferencias exitosas, por otro lado, tiene sus indicaciones, es importante no abusar del uso de esta tecnología, utilizarlo excesivamente incrementa el costo de las técnicas de reproducción asistida, por lo que no debe ser utilizado de manera rutinaria y si en pacientes con riesgo incrementado de presentar aneuploidías en su descendencia.

Acorde a nuestros resultados, en mujeres de 38 años o mayores: 37 de 100 D5 y 13 de 100 D6 blastocistos serán euploides. En mujeres de 37 años o menores: 67 de 100 D5 y 49 de 100 D6 blastocistos serán euploides. Con base a lo revisado en la bibliografía, no existen estudios que comparen la prevalencia de aneuploidías en

blastocistos D5 y D6 y su relación con la edad, nuestra investigación puede ser un parteaguas para en un futuro poder establecer el desenlace de los blastocistos obtenidos posterior a un procedimiento de reproducción asistida de alta complejidad.

18. REFERENCIAS

1. Bourdon M, Pocate-Cheriat K, Finet De Bantel, A, Grzegorzczuk-Martin V, et al. Day 5 versus Day 6 blastocyst transfers: a systematic review and meta-analysis of clinical outcomes. *Human Reproduction*. 2019;34(10):1948–1964. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez163>
2. Wu J, Zhang J, Kuang Y, Chen Q, et al. The effect of Day 3 cell number on pregnancy outcomes in vitrified-thawed single blastocyst transfer cycles. *Human Reproduction*. 2020;35(11), 2478–2487. <https://doi.org/10.1093/humrep/deaa209>
3. Fesahat F, Montazeri F, & Hoseini S. M. Preimplantation genetic testing in assisted reproduction technology. *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*. 2020;49(5), 101723. <https://doi.org/10.1016/j.jogoh.2020.101723>
4. Stohl H. E. & PLATT L. D. Introduction to Aneuploidy. En *Obstetric Imaging: Fetal Diagnosis and Care*. 2018; 2.^a ed., pp. 596–598. Elsevier. <https://www-clinicalkey-es.pbidi.unam.mx:2443/#!/content/book/3-s2.0-B9780323445481001479>
5. Sciorio R, Thong K, & Pickering S. J. Single blastocyst transfer (SET) and pregnancy outcome of day 5 and day 6 human blastocysts vitrified using a closed device. *Cryobiology*. 2018;84, 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.08.004>
6. Zwingerman, R., & Langlois, S. (2020). Committee Opinion No. 406: Prenatal Testing After IVF With Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, 42(11), 1437–1443.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jogc.2019.11.069>
7. Bishop, L., Owen, C., Patounakis, G., Hill, M., Koniarens, K., Devine, K., DeCherney, A., & Doyle, J. (2017). Do aneuploidy rates differ in blastocysts biopsied on day 5 vs day 6? *Fertility and Sterility*, 108(3), e284. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.07.842>
8. Fábregues F, Peñarrubia J, & González I. Esterilidad, infertilidad y técnicas de reproducción asistida. En *Ginecología*. 2020;10.^a ed., pp. 113–133. Elsevier. <https://www-clinicalkey-es.pbidi.unam.mx:2443/#!/content/book/3-s2.0-B9788491133841000061?scrollTo=%23hl0000087>

9. Greco E, Litwicka K, Minasi M. G, Cursio E, et al. Preimplantation Genetic Testing: Where We Are Today. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(12), 4381. <https://doi.org/10.3390/ijms21124381>

10. Yatsenko S, & Rajkovic A. Preimplantation Genetic Testing. *Perinatal Genetics*. 2019; 161–173. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-53094-1.00015-1>

11. Pérez Peña, E. (2019). *Atención Integral de la Infertilidad (incluye versión digital): Endocrinología, Cirugía y Reproducción Asistida* (4.^a ed.). EDITORIAL MEDICA PANAMERICANA S.A. DE C.V.

12. Yee C, & Tian T. Choosing between Day 5 and Day 6 blastocyst: Comparison of aneuploidy rates and pregnancy rates. *Reproductive BioMedicine Online*. 2019; 38, e31. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2019.03.051>

13. Taylor T, Patrick J, Gitlin S, Wilson J, et al. Comparison of aneuploidy, pregnancy and live birth rates between day 5 and day 6 blastocysts. *Reproductive BioMedicine Online*. 2014; 29(3), 305–310. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.06.001>

14. Roelens C, Santos-Ribeiro S, Becu L, Mackens S, et al. Frozen-warmed blastocyst transfer after 6 or 7 days of progesterone administration: impact on live birth rate in hormone replacement therapy cycles. *Fertility and Sterility*. 2020;114(1), 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.03.017>

15. Park D, Kim J, Chang E, Lee W, et al. Obstetric, Neonatal, and Clinical Outcomes of Day 6 vs. Day 5 Vitrified-Warmed Blastocyst Transfers: Retrospective Cohort Study With Propensity Score Matching. *Frontiers in Endocrinology*. 2020;11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00499>

16. Wu J, Zhang J, Kuang Y, Chen Q, et al. The effect of Day 3 cell number on pregnancy outcomes in vitrified-thawed single blastocyst transfer cycles. *Human Reproduction*. 2020;35(11), 2478–2487. <https://doi.org/10.1093/humrep/deaa209>

17. Vagnini L, Petersen C, Renzi A, Dieamant F, et al. Relationship between age and blastocyst chromosomal ploidy analyzed by noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidies (niPGT-A). *JBRA Assisted Reproduction*. 2020. Published. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20200061>

18. Kroener L, Ambartsumyan G, Briton-Jones C, Dumesic D, et al. The effect of timing of embryonic progression on chromosomal abnormality. *Fertility and Sterility*. 2012;98(4), 876–880. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.06.014>

19. Rubio, C., Bellver, J. & Rodrigo, L. In vitro fertilization with preimplantation genetic diagnosis for aneuploidies in advanced maternal age: A randomized, controlled study. *Fertility and Sterility* 2020, 107(5), 1122-1129. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.03.011>

19. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Cronograma	Diciembre 2020	Enero 2021	Febrero 2021	Marzo 2021	Abril 2021	Mayo 2021
Bosquejo del protocolo						
Inclusión de pacientes						
Análisis de Estadístico						
Discusión y Conclusiones						

20. ANEXOS

Cuadros

Cuadro 1. Número de blastocistos, dividido en euploides, aneuploides y por edad.

TABLA DE CONTINGENCIA					
Euploides			Aneuploides		
37 años o menores					
D5	D6	Total	D5	D6	Total
81	49	130	39	51	90
62.30%	37.70%	100%	43.30%	56.70%	100%
38 años o mayores					
D5	D6	Total	D5	D6	Total
54	14	68	92	88	180
79.40%	20.60%	100%	51.10%	48.90%	100%
Total			468		
135	63	198	131	139	270
68.20%	31.80%	100%	48.50%	51.50%	100%
Total D5 266			Total D6 202		

Cuadro 2. Estimación de riesgo de aneuploidias en blastocistos de día 5 (D5) y de día 6 (D6), por edad y subgrupos de estudio.

Estimación de riesgo de aneuploidías	OR	Intervalo de confianza al 95%		Valor de p
		Inferior	Superior	
Blastocistos D5 vs D6	2.2	1.5	3.3	<.001 ^a
Mujeres ≤37 años vs mujeres ≥38 años	3.8	2.5	5.6	<.001 ^a
Subgrupos 1A vs 1B	3.5	2.1	5.8	<.001 ^a
Subgrupos 2A vs 2B	6	3	12	<.001 ^a
Subgrupos 1A vs 2B	13	6.6	25.7	<.001 ^a

Subgrupos: 1A: blastocistos D5 de mujeres de 37 años o menores, 2A: blastocistos D6 de mujeres de 37 años o menores, 1B: blastocistos D5 de mujeres de 38 años o mayores y el 2B: blastocistos D6 de mujeres de 38 años o mayores. ^aCálculo de OR.

Figuras

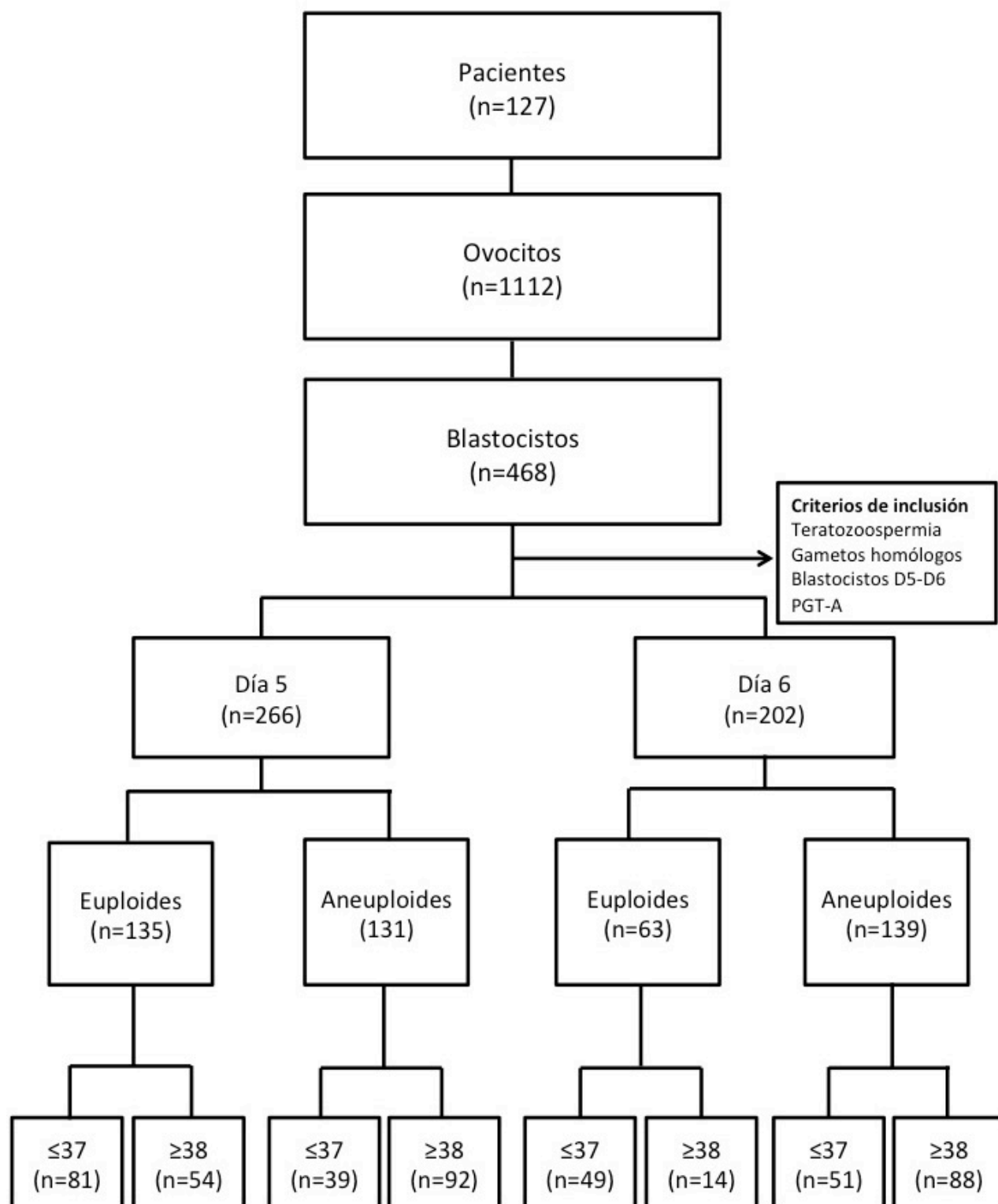


Figura 1. Diagrama de flujo con criterios de inclusión

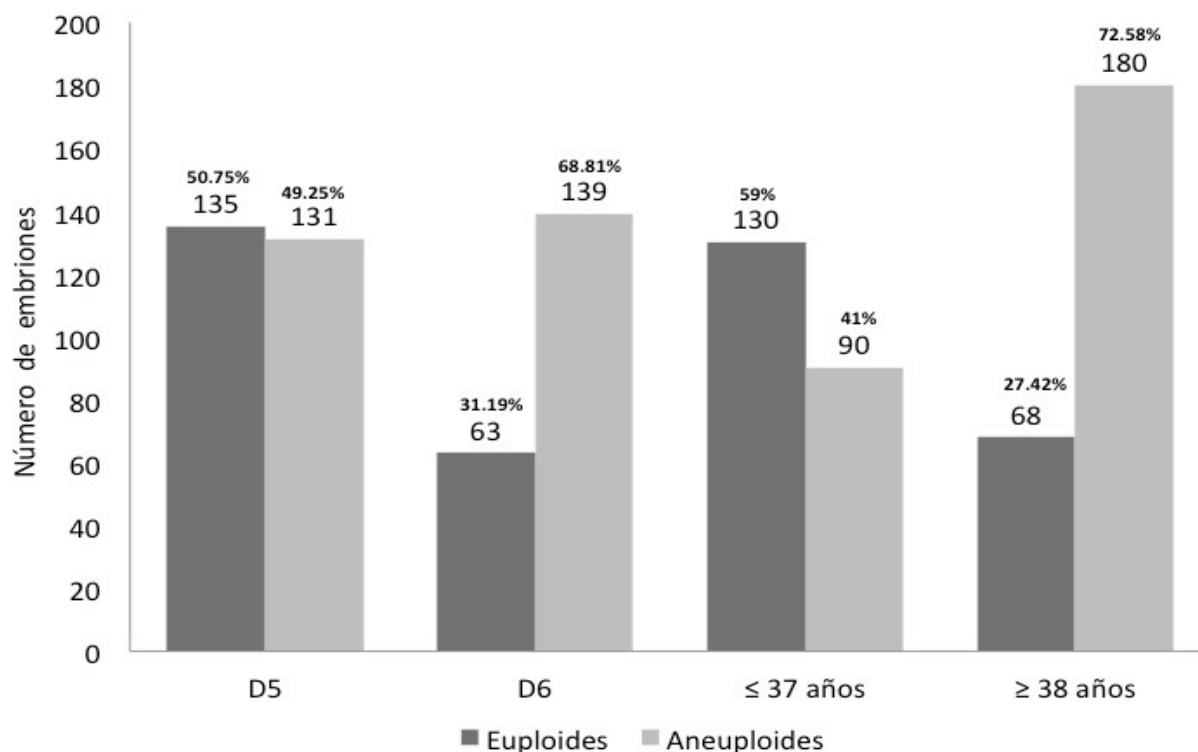


Figura 2. Número de embriones euploides y aneuploides en blastocistos de día 5 (D5) y 6 (D6), en mujeres ≤37 y ≥38 años.

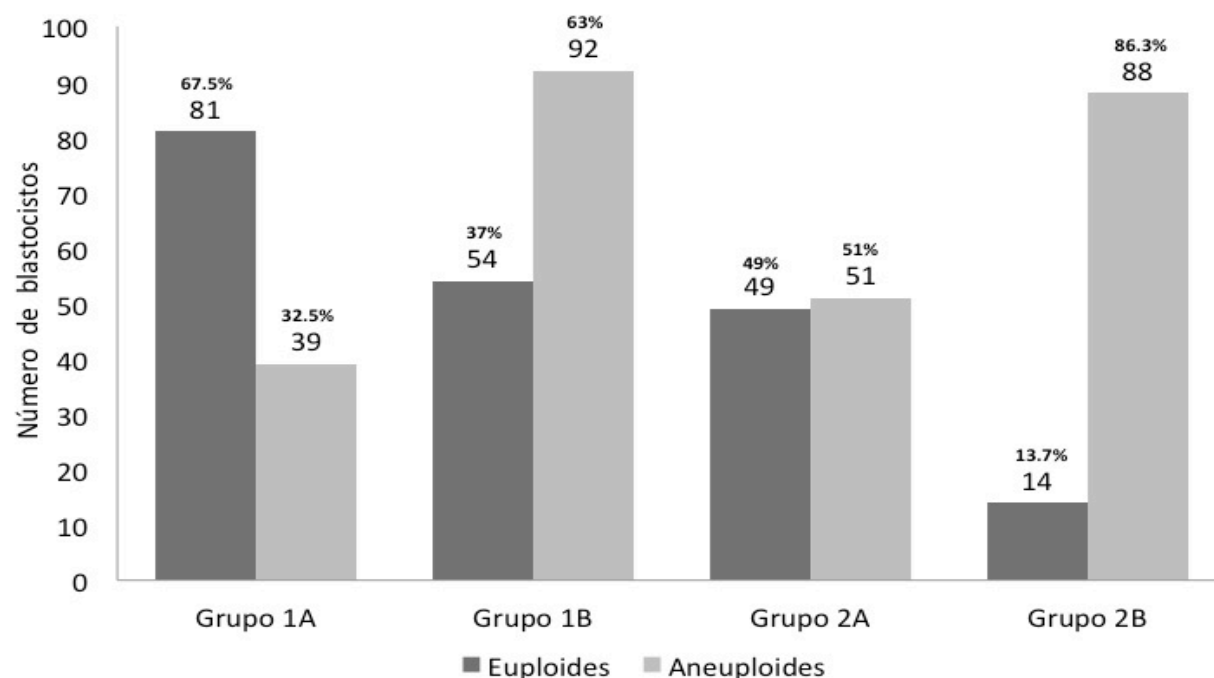


Figura 3. Número de blastocistos euploides y aneuploides en los subgrupos generados. Grupo 1A: día 5 en mujeres ≤ 37 años; Grupo 1B: día 5 en mujeres ≥ 38 años; Grupo 2A: día 6 en mujeres ≤ 37 años; Grupo 2B: día 6 en mujeres ≥ 38 años.